

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2020.04.007

· 中医中药与免疫 ·

丹皮酚对 β -1,3-葡聚糖诱导的小鼠巨噬细胞 Dectin-1/NLRP3 信号通路抑制作用研究^①

吴嘉迪 段强军 肖楠 汪天明 邵菁 吴大强 颜贵明 汪长中
(安徽中医药大学,合肥 230000)

中图分类号 R967 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2020)04-0415-07

[摘要] 目的:研究丹皮酚对 β -1,3-葡聚糖诱导的巨噬细胞上 Dectin-1/NLRP3 信号通路的影响。方法:培养小鼠 RAW264.7 巨噬细胞,并分成空白对照组、 β -1,3-葡聚糖诱导模型组、昆布多糖组和丹皮酚组, β -1,3-葡聚糖诱导巨噬细胞 24 h 建立 ALD 炎症模型。通过 MTT 法检测细胞活性,通过倒置显微镜观察各组形态学变化,通过 Western blot 检测小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白的表达,通过 RT-qPCR 检测小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 的表达,通过 ELISA 检测各组培养液中 IL-1 β 、IL-18 的分泌水平。结果:MTT 结果表明,与空白对照组相比, β -1,3-葡聚糖诱导模型组抑制细胞增殖活性减弱。与 β -1,3-葡聚糖诱导模型组相比,丹皮酚干预后细胞增殖活性增强。形态学观察发现,空白对照组细胞体积小,形态圆润。 β -1,3-葡聚糖诱导后细胞体积变大,分化严重,形态狭长。丹皮酚干预后细胞分化减轻,细胞形态近似圆形。Western blot、RT-qPCR 和 ELISA 结果表明,与空白对照组相比, β -1,3-葡聚糖能显著升高巨噬细胞中 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 的蛋白表达水平和 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达水平以及细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 的分泌水平。而与 β -1,3-葡聚糖诱导模型组相比,经丹皮酚干预后可明显降低巨噬细胞中 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 的蛋白表达水平和 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达水平以及细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 的分泌水平。结论:本研究结果表明丹皮酚可能通过抑制 β -1,3-葡聚糖诱导的 Dectin-1/NLRP3 信号通路上 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 的过表达从而有效降低终末炎症因子 IL-1 β 及 IL-18 的释放,进而有效抑制 β -1,3-葡聚糖诱导的 ALD 炎症反应。

[关键词] 丹皮酚; β -1,3-葡聚糖;巨噬细胞;Dectin-1/NLRP3 信号通路

Study on inhibitory effect of paeonol on Dectin-1/NLRP3 signaling pathway of macrophages induced by β -1,3-glucan

WU Jia-Di, DUAN Qiang-Jun, XIAO Nan, WANG Tian-Ming, SHAO Jing, WU Da-Qiang, YAN Gui-Ming, WANG Chang-Zhong. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of paeonol on β -1,3-glucan induced Dectin-1/NLRP3 signaling pathway in macrophages. **Methods:** Murine RAW264.7 macrophages were cultured and divided into the control group, the β -1,3-glucan induced model group, the Laminarin group and paeonol group. Macrophages were induced by β -1,3-glucan for 24 hours to establish ALD inflammatory model. The cell activity was measured by MTT assay. The morphological changes of each group were observed by inverted microscope. The levels of Dectin-1, Syk, NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1 protein in mouse RAW264.7 macrophages were evaluated by Western blot. The expression of Dectin-1, NLRP3 and caspase-1 mRNA in mouse RAW264.7 macrophages was analyzed by RT-qPCR. The secretion levels of IL-1 β and IL-18 in each group were detected by ELISA. **Results:** MTT results showed that compared with the control group, the proliferation activity of cells was weakened after induced by β -1,3-glucan. Compared with the β -1,3-glucan induced model group, the proliferation activity of cells was enhanced after paeonol treatment. Morphological observation showed that the control group cells were small in size and rounded in shape. After induced by β -1,3-glucan, the cells became larger, differentiated seriously and became long and narrow in shape. After the treatment of paeonol, the differentiation of cells was relieved, and

①本文受国家自然科学基金项目(81774034)和安徽省教育厅重点项目(KJ2018A0280)资助。

作者简介:吴嘉迪,男,硕士,主要从事中药抗酒精性脂肪肝研究,E-mail:wujiadi19941102@126.com。

通讯作者及指导教授:颜贵明,男,硕士,教授,硕士生导师,主要从事中药抗酒精性脂肪肝研究,E-mail:922-119@163.com。

the shape of cells was approximately round. Western blot, RT-qPCR and ELISA results showed that compared with the control group, β -1,3-glucan significantly increased the protein levels of Dectin-1, Syk, NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1, enhanced the mRNA expression of Dectin-1, NLRP3, caspase-1, and promoted the secretion levels of IL-1 β and IL-18 in cell supernatants. Compared with the β -1,3-glucan induced model group, the protein levels of Dectin-1, Syk, NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1 were decreased, the mRNA expression of Dectin-1, NLRP3 and caspase-1 were declined, and the secretion levels of IL-1 β and IL-18 were inhibited in the cells supernatant after paeonol treatment. **Conclusion:** The results suggest that paeonol may inhibit the over-expression of Dectin-1, Syk, NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and caspase-1 in the β -1,3-glucan-induced Dectin-1/NLRP3 signaling pathway, and thereby result in effectively reducing the release of terminal inflammatory factors IL-1 β and IL-18, and then effectively inhibiting β -1,3-glucan-induced ALD inflammatory response.

[Key words] Paeonol; β -1,3-glucan; Macrophages; Dectin-1/NLRP3 signaling pathway

酒精性肝病(alcohol liver disease, ALD)是临床上常见的肝脏疾病,该病主要是由于长时间大量酒精刺激引发的肝脏炎症损伤,表现为酒精性肝炎、酒精性肝纤维化及肝硬化,甚至肝功能衰竭。因此,ALD 已经成为需要迫切解决的公共卫生问题,如何防控 ALD 具有重要的现实意义。

丹皮酚(Paeonol, Pae)又称牡丹酚,为中药毛茛科植物牡丹、芍药和萝藦科植物徐长卿中提取分离出来的药效成分^[1]。现代研究表明,丹皮酚具有良好的抗炎、抗过敏、抗氧化、抗肿瘤等药理作用,且毒副作用小,目前在临床上应用广泛,主要应用于治疗血栓、动脉粥样硬化、酒精性脂肪肝病^[2,3]。另外,丹皮酚的口服和注射给药对炎症/疼痛相关的适应证有效,例如头痛、神经痛、肌肉疼痛、类风湿关节炎;丹皮酚的外用制剂可用于多种皮肤疾病,例如湿疹、皮炎、皮肤瘙痒、蚊虫叮咬、对过敏性鼻炎和感冒也有一定作用^[2]。因此,丹皮酚具有防治多种疾病的潜能。

随着近年来“肝-肠”轴理念的成熟,肠道菌群失调在 ALD 中作用日益显著^[4],尤其是肠道真菌群。有研究表明,长期酒精刺激,使得肠道真菌失调,特别是白色念珠菌过度定植,增加肠黏膜通透性^[5], β -1,3-葡聚糖作为真菌细胞壁的主要成分之一,其通过肠屏障转运到肝脏,与肝巨噬细胞表面受体 Dectin-1 结合活化经典 NLRP3/ASC/caspase-1 途径,通过 Syk 激酶使 NLRP3 自身寡聚,并募集接头分子 ASC,后者募集并催化 caspase-1 前体(pro-caspase-1)自身剪切活化,活化 caspase-1,释放 IL-1 β 、IL-18,引起肝脏炎症反应,并诱导肝细胞凋亡^[6-11]。有研究发现 β -1,3-葡聚糖作用于支气管上皮细胞后,NLRP3 炎症小体活化,且 IL-1 β 分泌增加^[12]。本课题组前期在体内实验中已经验证丹皮酚能有效抗 ALD^[13,14],但能否对于真菌菌群失调所致 β -1,3-葡聚糖介导的 ALD 发挥作用尚不清楚,本研究拟在体外建立 β -1,3-葡聚糖诱导巨噬细胞炎症模型,模拟 ALD 炎症损伤模型,从分子水平层面来

验证丹皮酚通过阻断 Dectin-1/NLRP3 信号通路来抗 ALD 炎症损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料与试剂 RW264.7 小鼠腹腔巨噬细胞系购于中科院上海细胞库;丹皮酚购自宣城市百草植物工贸有限公司(纯度>99%); β -1,3-D-葡聚糖、昆布多糖购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自上海 HAKATA 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 HyClone 公司;青霉素-链霉素溶液购自杭州碧云天公司;Trizol 试剂购自美国 ambion 公司;逆转录试剂盒、SYBR 荧光染料购自日本东洋纺公司;抗小鼠 β -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;抗小鼠 Dectin-1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;抗小鼠 caspase-1 抗体、抗小鼠 NLRP3 抗体和辣根过氧化物酶标记二抗均购自美国 Affinity 公司;抗小鼠 ASC 抗体和抗小鼠 Syk 抗体均购自沈阳万类生物科技有限公司;ECL 发光液购自美国 Advansta 公司;PCR 引物采用 Primer 5.0 设计,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;小鼠 IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂均购自泉州睿信生物科技有限公司。

1.1.2 实验仪器 IX51 倒置光学显微镜购自日本 Olympus 公司,TDZ4-WS 低速水平离心机购自上海卢湘仪有限公司,5430R 4℃离心机购自德国 Eppendorf 公司,ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、K3 型酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,PowerPac HC Power Supply 高电流电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 巨噬细胞培养及药物干预 将冻存在 -80℃ 冰箱的 RAW264.7 巨噬细胞复苏后,加入含 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青、链霉素的 DMEM 培养基中在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,每天定期观察细胞生长状态,定期更换培养基,当细胞达到对数生长期、融合度到 80% 以上时,

将细胞进行分组,即空白对照组、 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组、昆布多糖组、丹皮酚干预组。根据相关文献以及前期模型和药物筛选结果^[15-17],我们选用 70 $\mu\text{g/ml}$ β -1,3-D-葡聚糖造炎症模型,250 $\mu\text{g/ml}$ 作为昆布多糖剂量,480 $\mu\text{mol/L}$ 作为丹皮酚剂量。空白对照组和 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组用 DMEM 完全培养基对细胞进行培养 24 h,昆布多糖组用昆布多糖(250 $\mu\text{g/ml}$)对细胞进行干预 24 h,丹皮酚干预组用丹皮酚(480 $\mu\text{mol/L}$)对细胞进行干预 24 h,之后弃掉相应的培养基,除空白对照组加入新鲜含血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h 外,其余组加入 70 $\mu\text{g/ml}$ β -1,3-D-葡聚糖诱导 24 h,最后对四组的培养液与细胞进行收集。

1.2.2 MTT 法检测巨噬细胞的增殖活性 接种 $3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ RAW264.7 巨噬细胞于 96 孔板,待 24 h 完全贴壁后,弃上清,加 PBS 清洗 3 遍,空白对照组和 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组加入新鲜 DMEM 培养基,丹皮酚干预组加入丹皮酚(480 $\mu\text{mol/L}$),昆布多糖组加入昆布多糖(250 $\mu\text{g/ml}$),分别培养 24 h 后,弃掉相应的培养基,除空白对照组加入新鲜含血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h 外,其余组加入 70 $\mu\text{g/ml}$ β -1,3-D-葡聚糖诱导 24 h 后,避光加入 5 mg/ml MTT 工作液 20 μl ,放入二氧化碳培养箱避光培养 2 h 后,弃上清,加入 200 μl DMSO 对沉着在孔板底部的棕色甲臞沉淀进行溶解,室温放置摇床低速振荡 10 min,酶标仪进行比色,测定 490 nm 波长下吸光度值。

1.2.3 倒置显微镜观察细胞形态 接种 3×10^5 个/ml RAW264.7 巨噬细胞于 6 孔板,待 24 h 完全贴壁后,弃上清,加 PBS 清洗 3 遍,空白对照组和 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组用 DMEM 培养基对细胞进行孵育 24 h, Dectin-1 抑制剂昆布多糖组用昆布多糖(250 $\mu\text{g/ml}$)对细胞进行孵育 24 h,丹皮酚干预组用丹皮酚(480 $\mu\text{mol/L}$)对细胞进行孵育 24 h,之后弃掉相应的培养基,除空白对照组加入新鲜含血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h 外,其余组加入 70 $\mu\text{g/ml}$ β -1,3-D-葡聚糖诱导 24 h,之后弃上清,用 PBS 清洗 3 遍后,加入澄清 PBS,用倒置显微镜观察各组细胞形态变化。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 对巨噬细胞 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达的检测 将处理过的细胞用提前预冷的无菌 PBS 清洗 3 次后,用细胞刮刀将细胞刮下来并收集到无酶 EP 管中,根据 RNA 提取试剂盒的步骤进行 RNA 提取。之后根据逆转录试剂盒的步骤进行反转录成 cDNA。所有引物采

用 Primer Premier 5.0 软件设计,委托上海生工生物有限公司合成,各引物序列见表 1。RT-qPCR 反应体系 25 μl ; SYBR 荧光染料 12.5 μl , 上游引物(100 $\mu\text{mol/L}$)1 μl , 下游引物(100 $\mu\text{mol/L}$)1 μl , cDNA 0.5 μl , DEPC 水 10 μl 。在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应,反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 扩增定量程序 40 个循环,循环参数:变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 退火 50 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 溶解曲线 60 ~ 95 $^{\circ}\text{C}$, 加热速率 0.1 $^{\circ}\text{C/s}$, 管家基因为 β -actin, 实验重复 3 次。定量分析实时荧光定量 PCR 分别测定目的基因 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 及内参 β -actin 的 Ct 值, 实验结果取其平均值, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 来表示基因表达量变化。

1.2.5 Western blot 检测 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达 取 6 孔板细胞置于冰上, 每孔加 200 μl 含 PMSF 的 RIPA 裂解液, 用干净的刮刀将细胞刮于 EP 管中, 冰上裂解 30 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 之后加蛋白上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 冷却后, 电泳 80 V, 30 min; 120 V, 55 min, 转膜 120 V, 1 h 30 min, 室温封闭 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵一抗, 二抗室温孵育 2 h, 洗膜, 曝光成像, 通过 Image J 软件分析得出蛋白 IOD 值, 并根据目的蛋白 IOD/内参蛋白 IOD, 计算目的蛋白相对灰度值, 进行统计分析。

1.2.6 ELISA 法检测巨噬细胞培养液中 IL-1 β 和 IL-18 的含量 根据试剂盒说明书要求, 将细胞悬液于 3 000 r/min 离心 10 min 去除颗粒和聚合物; 设置标准品孔, 样本孔, 标准品孔加入不同浓度标准品 50 μl , 待测样品孔里先加入待测样品 10 μl 再加样品稀释液 40 μl ; 随后每孔加入 HRP 标记的检测抗体 100 μl , 封板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min; 弃液体, 反复洗涤 5 次, 拍干; 每孔加入底物 A、B 各 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 15 min; 每孔加入终止液 50 μl , 15 min 内 450 nm

表 1 实时荧光定量 PCR 基因引物序列及基因引物长度

Tab. 1 Primer sequences for RT-qPCR and length of gene primer

Gene	Primer	Length (bp)
β -actin-Forward	5'-ATCTGGCACCACCTTCTACAATG-3'	25
β -actin-Reverse	5'-CACGCTCGGTCAGGATCTTCATG-3'	23
Dectin-1-Forward	5'-CTGCAGTAAGCTTTCCTGGG-3'	20
Dectin-1-Reverse	5'-TCCCGCAATCAGAGTGAAG-3'	19
NLRP3-Forward	5'-TCCGGCCTTACTTCAATCTG-3'	20
NLRP3-Reverse	5'-TCACAGAGGAGCCTGAGTCC-3'	20
caspase-1-Forward	5'-AGAGGATTTCTTAAACGGATGCA-3'	22
caspase-1-Reverse	5'-TCACAAGACCAGGCATATTTCT-3'	22

波长下测各孔吸光度值。

1.3 统计学处理 采用 IBM SPSS Statistics 23 统计软件分析,计数资料用百分数来表示,采用 χ^2 检验,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间分析采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法进行分析, $P<0.05$ 判定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞增殖活性的影响 如图 1,MTT 法细胞增殖活性检测结果表明,与空白对照组相比, β -1,3-D-葡聚糖在 70 $\mu\text{g/ml}$ 浓度能够明显抑制 RAW264.7 巨噬细胞生长,细胞存活率下降 50%,差异具有统计学意义($P<0.001$)。与 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组相比,丹皮酚在 480 $\mu\text{mol/L}$ 浓度能够明显促进

RAW264.7 细胞增殖活力,细胞存活率上升,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞形态学的影响 如图 2,在 400 倍倒置显微镜下观察,空白对照组细胞体积偏小,呈现饱满圆润形态; β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组细胞分化严重,细胞体积增大,形态多不规则,有“伪足”伸出,细胞过于狭长,有的甚至呈梭形;丹皮酚干预组细胞分化明显改善,细胞体积变小,“伪足”现象明显减

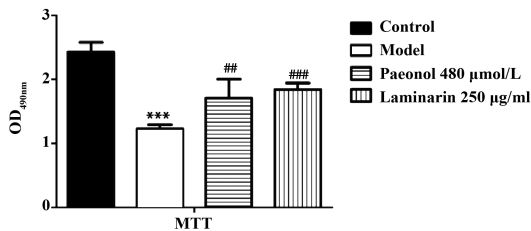


图 1 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞增殖活性的影响 ($n=6$)

Fig.1 Effect of Paeonol on β -1,3-D-glucan-induced RAW-264.7 macrophages proliferative activity ($n=6$)

Note:Compared with the control group, ***. $P<0.001$; compared with the β -1,3-D-glucan induced model group, ##. $P<0.01$, ###. $P<0.001$.

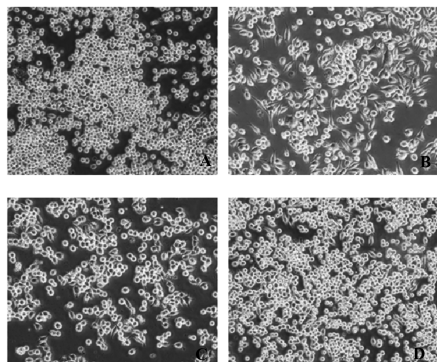


图 2 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞形态学的影响 ($n=6, \times 400$)

Fig.2 Effect of Paeonol on morphology of RAW264.7 macrophages induced by β -1,3-D-glucan ($n=6, \times 400$)

Note:A, B, C and D were respectively expressed as control group, β -1,3-D-glucan-induced model group, Paeonol 480 $\mu\text{mol/ml}$ group, Laminarin 250 $\mu\text{g/ml}$ group.

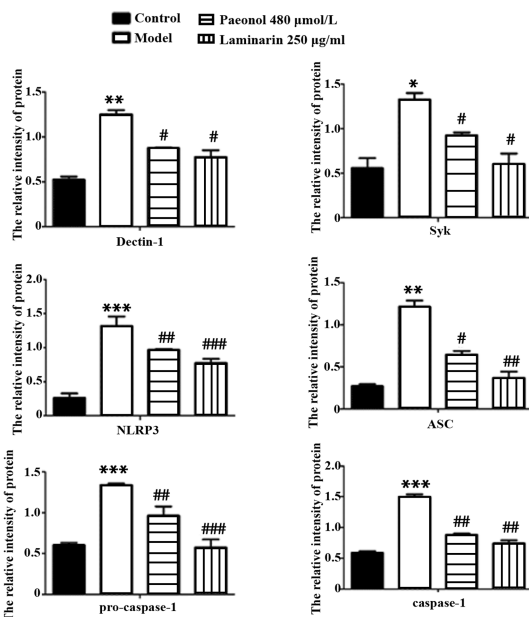
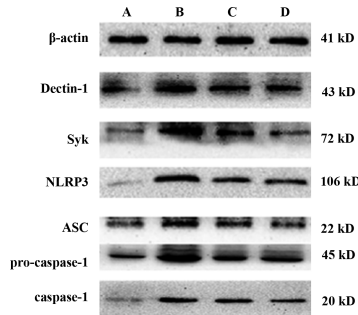


图 3 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达的影响 ($n=3$)

Fig.3 Effects of Paeonol on proteins expression of Dectin-1, Syk, NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and caspase-1 in RAW264.7 macrophages induced by β -1,3-D-glucan ($n=3$)

Note:A, B, C and D were respectively expressed as control group, β -1,3-D-glucan-induced model group, Paeonol 480 $\mu\text{mol/ml}$ group, Laminarin 250 $\mu\text{g/ml}$ group. Compared with the control group, * . $P<0.05$, ** . $P<0.01$, *** . $P<0.001$; compared with the β -1,3-D-glucan-induced model group, #. $P<0.05$, ##. $P<0.01$, ###. $P<0.001$.

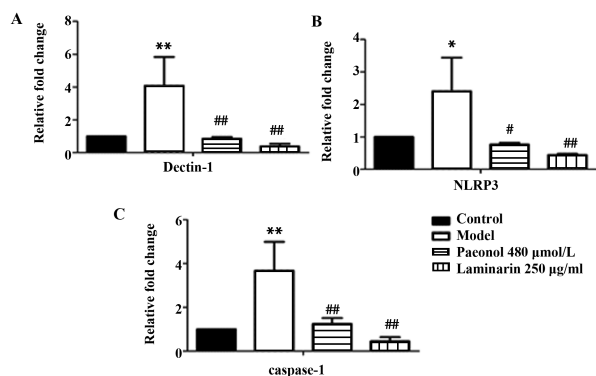


图4 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

Fig.4 Effect of Paeonol on mRNA expression of Dectin-1, NLRP3 and caspase-1 in RAW264.7 macrophages induced by β -1,3-D-glucan ($n=3$)

Note: Compared with the control group, *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$; compared with the β -1,3-D-glucan-induced model group, #. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$.

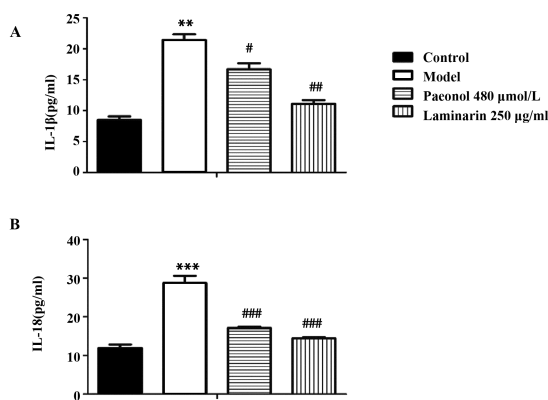


图5 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞分泌的 IL-1 β 、IL-18 的影响 ($n=3$)

Fig.5 Effect of Paeonol on secretion of IL-1 β and IL-18 in RAW264.7 macrophages induced by β -1,3-D-glucan ($n=3$)

Note: Compared with the control group, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$; compared with the β -1,3-D-glucan-induced model group, #. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$, ###. $P < 0.001$.

少,细胞大部分恢复至近圆形状。

2.3 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达的影响 如图3,与空白对照组相比, β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达量明显升高,差异具有统计学意义(P 均 <0.05)。与 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组相比,丹皮酚干预组

Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达量明显降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.4 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达的影响 如图4,与空白对照组相比, β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达量明显升高,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组相比,丹皮酚干预组 Dectin-1、NLRP3、caspase-1 mRNA 表达量明显降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.5 丹皮酚对 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞分泌 IL-1 β 、IL-18 的影响 如图5,与空白对照组相比, β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组细胞分泌的 IL-1 β 、IL-18 水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组相比,丹皮酚干预组细胞分泌的 IL-1 β 、IL-18 水平明显降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

β -1,3-葡聚糖是真菌细胞壁的主要成分,并在真菌过度增殖或死亡时从细胞壁脱落,通过与巨噬细胞表面受体结合诱导炎症因子产生^[18-20]。巨噬细胞则是通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)来识别 β -1,3-葡聚糖,并分泌炎症因子以促进炎症反应发生^[21]。PRRs 分细胞膜外和细胞膜内,膜外以 Dectin 家族受体研究较多,膜内则以 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLR)备受关注^[22]。其中 C 型凝集素结构域家族 7 成员 A (CLEC7A;也称为 Dectin-1)是 C 型凝集素受体家族的 PRRs,识别真菌细胞壁上暴露的 β -1,3-葡聚糖^[23,24]。NLRP3 也叫 NOD 样受体蛋白 3,属于炎性复合体的传感蛋白^[25]。当细胞受到感染刺激时,被激活的 NLRP3 形成 NLRP3 炎性小体,在炎性小体的作用下,促进下游炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放从而引起炎症反应^[26-28]。

新近研究表明,肠道真菌变化与 ALD 存在密切关联,长期酒精刺激后,肠道真菌菌群紊乱,真菌过度生长, β -葡聚糖作为许多共生真菌细胞壁的主要成分,通过肠屏障,经门静脉转运到肝脏,与肝巨噬细胞上的受体 Dectin-1 结合,激活 NLRP3 炎性小体,释放 IL-1 β 和 IL-18 诱发小鼠 ALD 炎症损伤^[5,29]。

在前期体内实验中,我们通过 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料喂养 C57BL/6 小鼠建立 ALD 模型,发

现酒精喂养导致肠道真菌失调,真菌丰度增加,血清中 β -1,3-D-葡聚糖水平升高,肝脏中 Dectin-1/NLRP3 信号通路上相关蛋白表达量增多,发生 ALD 炎症反应。丹皮酚干预后,肠道真菌失调得到改善,血清中 β -1,3-D-葡聚糖水平降低,肝脏中 Dectin-1/NLRP3 信号通路上相关蛋白表达量减少,ALD 炎症反应得到缓解。我们推断丹皮酚抗 ALD 炎症损伤可能与抑制 β -1,3-D-葡聚糖介导的 Dectin-1/NLRP3 信号通路存在相关性。

为了验证丹皮酚是否通过阻断 Dectin-1/NLRP3 信号通路来预防由 β -1,3-D-葡聚糖引起的 ALD 炎症损伤,我们应用 β -1,3-D-葡聚糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立体外 ALD 炎症损伤模型,在 β -1,3-D-葡聚糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后,观察丹皮酚在造模前干预下能否对 β -1,3-D-葡聚糖致炎起到预防保护作用,并检测 Dectin-1/NLRP3 信号通路相关蛋白是否发生改变。我们还应用了 Dectin-1 阻断剂昆布多糖来验证 β -1,3-D-葡聚糖刺激效果。实验研究表明,通过 MTT 法检测细胞增殖活性与倒置显微镜形态学观察发现 β -1,3-D-葡聚糖诱导下的 RAW264.7 巨噬细胞发生炎症损伤,细胞增殖活力减弱,细胞存活率低下,而丹皮酚干预后能有效缓解并改善 RAW264.7 巨噬细胞的炎症损伤,提升细胞增殖活力。为了探究丹皮酚抗炎症损伤的作用机制,并依据前期的体内实验,我们从 β -1,3-D-葡聚糖结合受体 Dectin-1 为切入点,进而涉及 Dectin-1/NLRP3 相关信号通路。经实验证实, β -1,3-D-葡聚糖诱导 24 h 后的 RAW264.7 巨噬细胞中存在 Dectin-1/NLRP3 信号通路激活,相比于空白对照组, β -1,3-D-葡聚糖诱导模型组 Dectin-1/NLRP3 信号通路相关蛋白诱导 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 以及炎症因子 IL-1 β 、IL-18 都明显升高。而丹皮酚干预 24 h 后可显著降低 β -1,3-D-葡聚糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达水平和 Dectin-1、NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达水平,以及细胞分泌的 IL-1 β 、IL-18 水平。提示丹皮酚能显著预防 β -1,3-D-葡聚糖诱导所致的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应,从而缓解和改善细胞增殖活力减弱与细胞损伤,推测可能与阻断 Dectin-1/NLRP3 信号通路的激活有关,以上实验结果与前期体内实验结果一致。通过体内、体外实验验证,我们可以推定丹皮酚是通过抑制 β -1,3-D-葡聚糖,阻断 Dectin-1 与之结合,进而抑制 NLRP3 炎症小体激活,从而抑制巨噬细胞分泌 IL-1 β 、IL-18 水平

降低,缓解 ALD 炎症损伤。与 Xiao 等^[30]报道的肠道细菌菌群失调导致 LPS 与 TLR4 结合,并激活核因子 NF- κ B 诱导的 ALD 炎症损伤相比,我们的研究是基于肠道真菌菌群及其代谢产物 β -1,3-D-葡聚糖在 ALD 中的显著作用,因此,改善肠道真菌菌群,抑制 β -1,3-D-葡聚糖已经成为预防 ALD 的重要的治疗靶点和潜在手段。

总之,丹皮酚可能通过抑制 β -1,3-D-葡聚糖诱导的巨噬细胞 Dectin-1/NLRP3 信号通路上 Dectin-1、Syk、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 的表达从而有效降低终末炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的释放,进而有效抑制 ALD 炎症反应。我们的实验数据进一步验证了丹皮酚可以预防 ALD 炎症损伤,深入探讨了丹皮酚对肠道真菌代谢产物 β -1,3-葡聚糖相关的 Dectin-1/NLRP3 信号通路关键蛋白的调控作用,为将其开发成新型的抗 ALD 药物提供新的研究思路和重要的实验依据。

参考文献:

- [1] 颜贵明,戴敏,宣自华. 丹皮酚对酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用[J]. 中药材,2015,38(3):550-555.
Yan GM, Dai M, Xuan ZH. Therapeutic effect of Paeonol on alcoholic fatty liver rats [J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(3): 550-555.
- [2] Zhang L, Li DC, Liu LF. Paeonol: Pharmacological effects and mechanisms of action [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 413-421.
- [3] Sun X, Wang P, Yao LP, et al. Paeonol alleviated acute alcohol-induced liver injury via SIRT1/Nrf2/NF- κ B signaling pathway [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 60: 110-117.
- [4] 栾倩,哈成勇,张玉彬. 基于肝肠轴治疗酒精性肝病的研究进展[J]. 药物生物技术, 2018, 25(4): 90-93.
Luan Q, Ha CY, Zhang YB. Research progress in the treatment of alcoholic liver disease based on hepatic intestinal axis [J]. Chin J Pharm Biotech, 2018, 25(4): 90-93.
- [5] Yang AM, Inamine T, Hochrath K, et al. Intestinal fungi contribute to development of alcoholic liver disease [J]. J Clin Invest, 2017, 127(7): 2829-2841.
- [6] Larock CN, Victor N. Inflammasome/IL-1 β responses to streptococcal pathogens [J]. Front Immunol, 2015, 6: 518.
- [7] Petrasek J, Irachetavellve A, Saha B, et al. Metabolic danger signals, uric acid and ATP, mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease [J]. J Leukocyte Biol, 2015, 98(2): 249-256.
- [8] Kim JW, Roh YS, Jeong H, et al. Spliceosome-associated protein 130 exacerbates alcohol-induced liver injury by inducing NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β in mice [J]. Am J Pathol, 2018, 188(4): 967-980.
- [9] Petrasek J, Bala S, Csak T, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in

- mice[J]. *J Clin Invest*,2012,122(10):3476-3489.
- [10] 李晓瑞,游雷鸣,陈丹军,等. 稳定敲低 NLRP3 基因的小鼠巨噬细胞系的建立与鉴定[J]. *中国免疫学杂志*,2018,35(3):398-402.
Li XR, You LM, Chen DJ, *et al.* Establishment and identification of mouse macrophage cell line stably knocking down NLRP3 gene[J]. *Chin J Immunol*,2018,35(3):398-402.
- [11] Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, *et al.* An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*[J]. *Cell Host Microbe*,2009,5(5):487-497.
- [12] 黄燕华,华 檬,崔学范. 芍药苷减弱真菌葡聚糖诱导的支气管上皮细胞内 NLRP3 炎性小体活化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2017,39(3):32-37.
Hang YH, Hua M, Cui XF. Paeoniflorin attenuates the activation of NLRP3 inflammasome induced by fungal glucan in human bronchial epithelial cells[J]. *Acta Univ Med Nanjing*,2017,39(3):32-37.
- [13] 颜贵明,戴 敏,宣自华,等. 丹皮酚对急性肝细胞损伤的保护作用[J]. *中成药*,2015,37(4):854-858.
Yan GM, Dai M, Xuan ZH, *et al.* Protective effect of paeonol on acute hepatocyte injury[J]. *Chin Tradit Pat Med*,2015,37(4):854-858.
- [14] 颜贵明,戴 敏,班 超,等. 丹皮药用组合物对小鼠酒精性脂肪肝作用的配伍研究[J]. *中药药理与临床*,2010,26(2):56-58.
Yan GM, Dai M, Ban C, *et al.* Study on the compatibility of Danpi pharmaceutical composition on alcoholic fatty liver in mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*,2010,26(2):56-58.
- [15] 谢先梅,李 超,孙 颖,等. 丹皮酚通过抑制 p38 MAPK/N-SMase2 通路减少脂多糖诱导的 THP-1 细胞外泌体分泌[J]. *中国动脉硬化杂志*,2019,27(1):20-26.
Xie XM, Li C, Sun Y, *et al.* Paeonol reduces lipopolysaccharide-induced secretion of THP-1 extracellular secretion by inhibiting p38 MAPK/N-SMase2 pathway[J]. *Chin J Arterioscler*,2019,27(1):20-26.
- [16] 陈 青,曾 荣,沈永年,等. C 型凝集素 1 受体参与中性粒细胞体外杀伤白念珠菌活性的实验研究[J]. *中华皮肤科杂志*,2013,46(8):543-546.
Chen Q, Zeng R, Shen YN, *et al.* Experimental study on the activity of C-type lectin 1 receptor in killing *Candida albicans* in vitro by human neutrophils[J]. *Chin J Dermatol*,2013,46(8):543-546.
- [17] 俞晓丽,郭兰芳,陈 璐,等. β -葡聚糖对小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 的免疫刺激作用[J]. *中国微生物学杂志*,2009,21(10):902-903.
Yu XL, Guo LF, Chen Y, *et al.* Immunostimulatory effects of β -glucan on mouse mononuclear macrophage cell line RAW264.7[J]. *Chin J Microecol*,2009,21(10):902-903.
- [18] Fesel PH, Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants[J]. *Fungal Genet Biol*,2016,90:53-60.
- [19] Chan GC, Chan WK, Sze DM, *et al.* The effects of β -glucan on human immune and cancer cells[J]. *J Hematol Oncol*,2009,2:25.
- [20] Underhill DM, Pearlman E. Immune interactions with pathogenic and commensal fungi: a two-way street[J]. *Immunity*,2015,43(5):845-858.
- [21] Medzhitov R, Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways[J]. *Immunol Rev*,2010,173(1):89-97.
- [22] Ting PY, Lovering RC, Alnemri ES, *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature[J]. *Immunity*,2008,28(3):285-287.
- [23] Elder MJ, Webster SJ, Ronnie C, *et al.* β -glucan size controls dectin-1-mediated immune responses in human dendritic cells by regulating IL-1 β production[J]. *Front Immunol*,2017,8:791.
- [24] 刘绍兰,吴婧楠,李若瑜,等. 模式识别受体 Dectin-1 的免疫学研究进展[J]. *中国免疫学杂志*,2018,34(7):1102-1107.
Liu SL, Wu JN, Li RY, *et al.* Progress in immunology of pattern recognition receptor Dectin-1[J]. *Chin J Immunol*,2018,34(7):1102-1107.
- [25] Li LW, Gui HL, Peng Q, *et al.* NLRP3 inflammasome: a novel link between lipoproteins and atherosclerosis[J]. *Arch Med Sci*,2016,12(5):950-958.
- [26] Li LW, Peng Q, Jian Z, *et al.* NLRP3 and downstream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease[J]. *Arch Med Sci*,2014,10(4):791-800.
- [27] Kim JK, Jin HS, Suh HW, *et al.* Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signaling[J]. *Immunol Cell Biol*,2017,95(7):584-592.
- [28] 王如华,李勇华,龙 明,等. 黄芪匀浆膳通过 NLRP3 炎症小体通路影响创伤应激大鼠肠黏膜免疫功能[J]. *中国免疫学杂志*,2019,35(18):2227-2232.
Wang RH, Li YH, Long M, *et al.* Effects of Astragalus homogenized diet on intestinal mucosal immune function and NLRP3 inflammatory corpuscle pathway of traumatic stress rats[J]. *Chin J Immunol*,2019,35(18):2227-2232.
- [29] Shrestha R, Shrestha R, Qin XY, *et al.* Fungus-derived hydroxyl radicals kill hepatic cells by enhancing nuclear transglutaminase[J]. *Sci Rep*,2017,7(1):4746.
- [30] Xiao J, Zhang R, Zhou Q, *et al.* Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp phenolic extract provides protection against alcoholic liver injury in mice by alleviating intestinal microbiota dysbiosis, intestinal barrier dysfunction and liver inflammation[J]. *J Agric Food Chem*,2017,65(44):9675-9684.

[收稿 2019-10-25 修回 2020-01-09]

(编辑 张晓舟)